

文章编号:1000-0615(2007)05-0591-07

半滑舌鳎雌性特异扩增片段长度多态性标记的筛选与应用

李 静¹, 陈松林¹, 邓思平¹, 田永胜¹, 沙珍霞¹,
王清印¹, 庄志猛¹, 徐建勇¹, 温海深²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;
2. 中国海洋大学生命科学与技术学院, 山东 青岛 266003)

摘要:半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)为东北亚特有的名贵冷温性比目鱼类,为我国养殖业的新宠。半滑舌鳎雌鱼生长速度是雄性的2~3倍,若能实现单雌化养殖将大大提高养殖业的经济效益。本研究利用扩增片段长度多态性(AFLP)技术,应用64个引物组合,检测了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)雌雄基因组DNA的多态性,筛选与半滑舌鳎性别相关的AFLP分子标记。实验经过3轮筛选和验证,4个引物组合扩增出7个雌性个体出现频率为100%的DNA片段,我们认为这7个标记是半滑舌鳎雌性特异的AFLP标记,分别命名为CseF382、CseF575、CseF783、CseF464、CseF136、CseF618和CseF305。同时,将标记CseF382成功转化为SCAR标记,测定了该标记的DNA序列,建立了半滑舌鳎遗传性别鉴定的PCR技术,为半滑舌鳎性别决定机制的研究和性别控制奠定了重要基础。

关键词:半滑舌鳎;扩增片段长度多态性(AFLP);性别;分子标记;雌性特异标记

中图分类号:S 917.4

文献标识码:A

Isolation and application of female-specific amplified fragment length polymorphism markers in *Cynoglossus semilaevis*

LI Jing^{1,2}, CHEN Song-lin¹, DENG Si-ping¹, TIAN Yong-sheng¹,

SHA Zhen-xia¹, WANG Qing-yin¹, ZHUANG Zhi-meng¹, XU Jian-yong¹, WEN Hai-shen²

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China;

2. Life Sciences and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) is a cultured marine fish exploited recently in China. The female individuals of tongue sole grow 1–2 times faster than male individuals. Thus, the development of all-female stock would be of significant benefit for aquaculture. Sex-related molecular marker is a useful tool for studying sex determination mechanism and controlling fish sex. In order to screen sex specific molecular markers, AFLP analysis technique was firstly developed in half-smooth tongue-sole. DNA extraction from liver tissues was carried out according to standard procedures. Phenotypic sex of the fish was determined by histological sectioning and staining. 64 AFLP primer-combinations were used to screen the genome DNA of half-smooth tongue-soles. 4 primer-combinations amplified 7 female-

收稿日期:2006-07-05

资助项目:农业部948项目(973096);国家863项目(2006AA10A403);山东省农业良种工程重大项目

作者简介:李 静(1980-),女,山东淄博人,硕士,主要从事海洋生物分子生物学研究

通讯作者:陈松林, Tel:0532-85844606, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

specific markers that were female specific in half-smooth tongue-sole. The 7 female-specific markers were named CseF382, CseF575, CseF783, CseF464, CseF136, CseF618 and CseF305, respectively. One female-specific AFLP marker (CseF382) was amplified, recovered from the gels, cloned, and sequenced. This female-specific AFLP marker was converted into single locus PCR marker of a sequence-characterized amplified region (SCAR). A simple PCR method of using the specific primers was developed for identifying genetic sex of half-smooth tongue sole. This PCR method will be more efficient and less expensive than with AFLP markers. The isolation of sex-specific molecular markers lays a basis for elucidation of sex determination mechanism, and provides a tool for sex control in half-smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis* Günther; AFLP; sex; molecular marker; female-specific marker

鱼类性别决定和分化机制相当复杂,鱼类的表型性别既受基因的决定,又受环境因子的影响。在脊椎动物中,鱼类的性别决定机制具有其特殊性。鉴于鱼类的性别决定机制和性别控制研究既有科学意义,又有应用价值,因此鱼类的性别决定机制一直以来受到了极大的关注。采用分子标记技术筛选鱼类性别相关分子标记已成为国际上的发展趋势之一。扩增片段长度多态性(AFLP)技术是荷兰科学家 Zebeau Marc 和 Vos Pieter 等发展的一种检测 DNA 多态性的新方法^[1]。该技术结合了限制性酶切片多样性(RFLP)和多聚酶链式反应(PCR)的优点,根据目的 DNA 酶切片段的有无,通过选择性地 PCR 扩增来分析 DNA 多态性,该技术在鱼类遗传结构分析和性别相关分子标记筛选方面具有重要应用价值^[2]。迄今为止,国内外利用 AFLP 技术在鱼类中筛选性别特异标记的研究罕见报道,只在个别淡水鱼如三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus* L.)^[3]和孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)^[4]等鱼类中有一些报道,而且筛选到的分子标记都是与雄性性别相关。而有关鱼类雌性特异分子标记,迄今国内外均未见报道。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)俗称牛舌头、鲷目、鲷米,属于鲽形目、舌鲷科,为东北亚特有的名贵冷温性比目鱼类,生长快、个体大、营养丰富,为我国黄海、渤海区地方性大型经济鱼类之一。我国有关半滑舌鲷的研究开始于 20 世纪 80 年代末、90 年代初,报道大多涉及其生长与繁殖^[5-7],以及细胞遗传学和染色体核型方面的研究^[8]。由于半滑舌鲷雌雄个体生长速度差异很大,雌鱼的生长速度是雄鱼的 2~3 倍;而且,成鱼雌雄个体的差异明显,雌鱼最大体长可达 820 mm,雄鱼的最大体长为 420 mm 左右,最小

体长只有 198 mm。因此,开展半滑舌鲷性别控制和全雌育种技术研究,对于提高半滑舌鲷的养殖产量和经济效益具有重要意义。而目前限制半滑舌鲷性别控制研究的关键因子之一就是缺乏遗传性别鉴定的分子生物学技术。本研究从 DNA 水平出发,利用 AFLP 技术检测半滑舌鲷雌雄基因组 DNA 间的差异,筛选出了半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 标记,并将其中 1 个 AFLP 标记成功转化为 SCAR 标记,从而建立了半滑舌鲷遗传性别鉴定的 PCR 技术。为研究半滑舌鲷性别决定机制、筛选性别特异功能基因、以及进行全雌育种等奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

两批性别分化的半滑舌鲷养殖个体,第一批使用了雌雄各 10 个个体,第二批使用了 15 个雌性个体和 13 个雄性个体。实验材料来源于烟台海阳黄海水产有限公司和莱州明波水产有限公司。实验鱼体长为 19~35 cm、体重为 40~200 g。取其肝脏和性腺,前者迅速放入液氮中速冻,后置于 -80 °C 下保存备用,后者放入固定液中保存,用于做石蜡切片。

1.2 基因组 DNA 的提取

实验用 DNA 提取自半滑舌鲷肝脏,DNA 提取方法按照已报道的进行^[9],提取的 DNA 样品用 GeneQuant pro 核酸测定仪测定其浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,再用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的浓度和纯度。

1.3 实验鱼生理性别的确定

从外部形态和性腺石蜡切片观察来确定实验鱼的生理性别,首先,从外部形态来看,在相同的养殖环境下,性别分化的同龄鱼,雌性个体明显比

雄性个体大,通过个体大小初步将雌性个体和雄性个体分开;然后再将采集的不同个体的性腺进行石蜡切片,光学显微镜观察,进一步确定其性别。

1.4 AFLP 反应

所用试剂为美国 LI-COR 公司生产的 AFLP 试剂盒,AFLP 反应主要按照试剂盒说明书上的方法进行。

酶切 取 100 ng 半滑舌鳎基因组 DNA, 1.0 μL *EcoRI*/*MseI* 酶混合物,2.5 μL 缓冲液,加水至反应总体积为 12.5 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 5~6 h,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,酶切充分的样品 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 min,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

连接 在充分酶切的样品中加入 12.0 μL 接头混合物,0.5 μL T4 DNA 连接酶,轻柔混匀离心,20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。用 TE 将连接产物稀释 10 倍作为预扩增的模板,剩余产物可于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存、备用。

预扩增 取稀释的连接产物 2.5 μL , 预扩增引物混合物 20.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U \cdot μL^{-1}) 0.5 μL , PCR 反应共 20 个循环。预扩增产物用去离子水或 TE 缓冲液 1:40 稀释,作为选择性扩增的模板。剩余的预扩增产物可 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存,以备将来使用。

选择性扩增 取 *Taq* DNA 聚合酶与水的混合液 6.0 μL , 预扩增 DNA 稀释产物 2.0 μL , *MseI* 引物 2.0 μL , IRDye700 标记的 *EcoRI* 引物 A 0.5 μL , IRDye 800 标记的 *EcoRI* 引物 B 0.5 μL 进行 PCR 反应。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 13 个循环后变为:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,23 个循环。扩增完的样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶,用 LI-COR 公司的 DNA Analyzer 进行电泳,电泳条件:电压 1500 V,功率 40 W,电流 40 mA,温度 45 $^{\circ}\text{C}$ 。先预电泳 25 min,上样后再正式电泳 3 h 30 min。

1.6 AFLP 引物组合以及目的条带的筛选

用 LI-COR 公司的 16 条引物组成 64 个引物组合,扫描雌雄两个群体的基因组 DNA,寻找性别特异的标记。具体的筛选过程如下所示:

(1)以第 1 批半滑舌鳎基因组 DNA 为模板,进行第 1 轮 AFLP 反应,分析各个引物扩增产物

的 AFLP 电泳图谱,找出雌雄两个群体的差异性条带作为候选的性别特异的 AFLP 分子标记,将所对应的选择性扩增引物组合作为下一轮验证的候选引物;

(2)以第 2 批半滑舌鳎的每个个体的基因组 DNA 为模板,选用扩增出候选 AFLP 标记的选择性扩增引物,进行第 2 轮 AFLP 反应,观察电泳图谱,验证第 1 轮 AFLP 反应所得的候选标记的正确性。

1.7 AFLP 标记的克隆与序列分析

用筛选到的普通非荧光引物重新进行选择选择性扩增、电泳、银染显示目的条带。从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的条带,进行回收。以适量溶解有目的片段的上清液作为再扩增的模板进行扩增,将扩增产物用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) 回收试剂盒,按说明书提供的方法进行纯化。将目的 DNA 片段克隆到 pMD18-T (Takara) 载体,阳性克隆在上海 Invitrogen 生物工程公司用 ABI3730 进行序列分析。

1.8 AFLP 标记转化为 SCAR 标记

根据 DNA 序列分析结果,分别合成两个特异引物:引物 1(20 bp)5'-ATTCAGTACCCCTGAGAGC-3';引物 2(22 bp)3'-GTAAACAGCACACTCAACAA-5'。以不同性别的半滑舌鳎总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应按已报道的方法进行。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的抽提与酶切

DNA 样品经抽提和纯化后,样品中 RNA 基本被去除。选取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.80~1.90 的 DNA 样品,琼脂糖凝胶电泳分析表明提取的基因组 DNA 样品几乎没有降解,片段比较完整,可以用于基因组酶切。随后用 *EcoRI*/*MseI* 双酶切基因组 DNA,电泳分析表明 DNA 样品酶切完全(结果未显示),可以用于下一步连接反应。

2.2 性别特异 AFLP 标记的筛选

本研究利用 64 个 AFLP 选择性扩增引物组合,扫描半滑舌鳎雌雄各 10 个个体的基因组 DNA,有 4 个引物组合扩增产物的电泳图上出现了总共 7 条雌雄差异显著的条带,这些 DNA 标记的命名、所用引物组合、DNA 片段大小见表 1。在雌性群体中的出现频率为 100%,在雄性群体

中,只有个别个体出现。随后,选取这 4 个引物组合利用另外的 15 个半滑舌鳎的雌性个体和 13 个雄性个体的基因组 DNA 为模板,进行 AFLP 扩增,得到了预期的 7 个 AFLP 分子标记,这 7 个

AFLP 标记只在雌性个体中出现,而在雄性个体不出现(图 1 ~ 图 7),所以,认为这 7 个 DNA 条带是半滑舌鳎雌性特有的 AFLP 标记。

表 1 7 个在半滑舌鳎雌雄群体中差异极显著的 AFLP 位点

Tab. 1 7 significant different AFLP loci in half-smooth tongue-sole female and male populations

命名 name	引物组合 primer combinations	片段长度(bp) size	雌性群体(%) females	雄性群体(%) males
CseF382	E-ACT/M-CAA	382	15/15(100)	0/13(0)
CseF575	E-ACT/M-CAA	575	15/15(100)	0/13(0)
CseF783	E-ACT/M-CAA	783	15/15(100)	0/13(0)
CseF464	E-AGC/M-CTG	464	15/15(100)	0/13(0)
CseF136	E-AGC/M-CTG	136	15/15(100)	0/13(0)
CseF618	E-ACA/M-CAG	618	15/15(100)	0/13(0)
CseF305	E-ACC/M-CTA	305	15/15(100)	0/13(0)

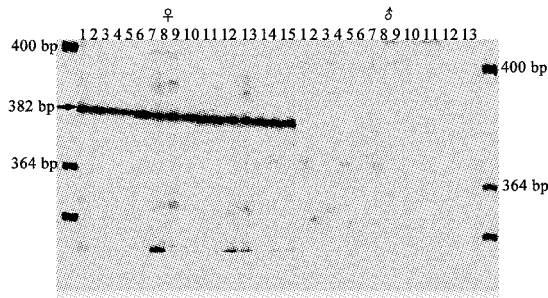


图 1 引物组合 E-ACT/M-CAA 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF382

Fig. 1 Significant different band CseF382 amplified by E-ACT/M-CAA combination

左边 1-15 为雌性个体,右边 1-13 为雄性个体,下同

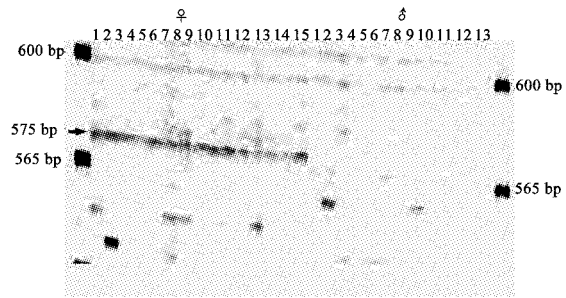


图 2 引物组合 E-ACT/M-CAA 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF575

Fig. 2 Significant different band CseF575 amplified by E-ACT/M-CAA combination

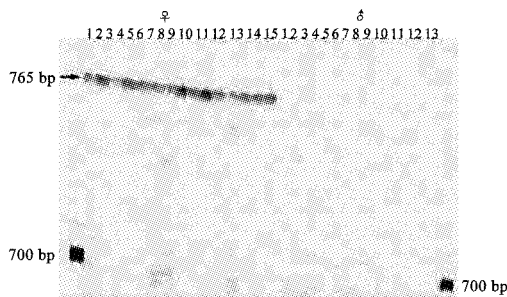


图 3 引物组合 E-ACT/M-CAA 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF783

Fig. 3 Significant different band CseF783 amplified by E-ACT/M-CAA combination

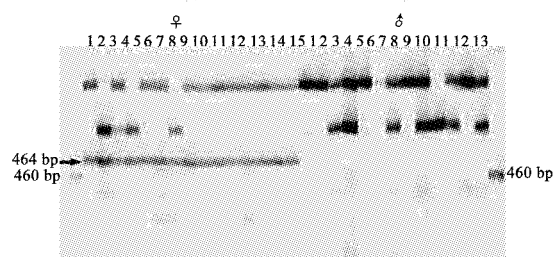


图 4 引物组合 E-AGC/M-CTG 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF464

Fig. 4 Significant different band CseF464 amplified by E-AGC/M-CTG combination

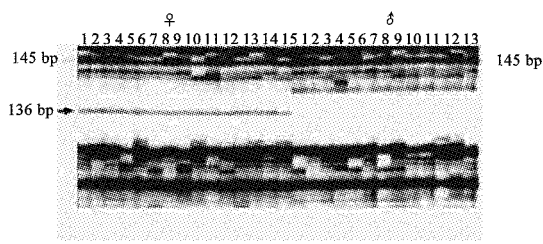


图 5 引物组合 E-AGC/M-CTG 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF136
Fig. 5 Significant different band CseF136 amplified by E-AGC/M-CTG combination

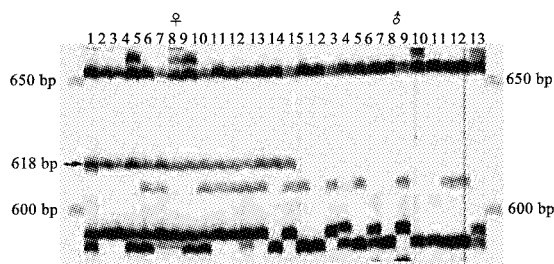


图 6 引物组合 E-ACA/M-CAG 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF618
Fig. 6 Significant different band CseF618 amplified by E-ACA/M-CAG combination

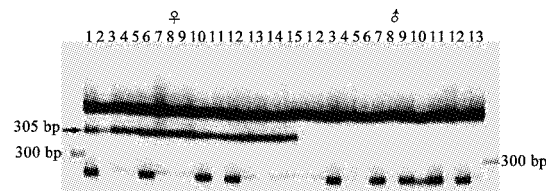


图 7 引物组合 E-ACC/M-CTA 产生的雌雄群体差异极显著的带 CseF305
Fig. 7 Significant different band CseF305 amplified by E-ACC/M-CTA combination

2.3 特异 AFLP 标记的序列分析

将 8 个个体的雌性特异 AFLP 标记 CseF382 的核苷酸序列,用 DNAMAN Version 4.0 进行多序列比对,同源率为 99.37%,表明各个个体得到的条带是同一个序列。共有序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST 软件进行,在 GenBank 中没有找到任何同源的序列。

2.4 SCAR 引物的合成及遗传性别的鉴定

根据测得的核苷酸序列,合成了 1 对 PCR 引物。用此对引物扩增雌雄各 26 个个体的基因组 DNA,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 8 所示,从图中可以看出,所有 26 个雌性个体均有 1 条特异的 DNA 条带,而所有雄性个体则都没有这样的 DNA 条带,表明 AFLP 标记成功地转化成 SCAR 标记,同时表明这个 SCAR 标记是雌性特异的。因此,本研究首次建立了半滑舌鳎遗传性别鉴定的 PCR 技术,可以用于半滑舌鳎遗传性别鉴定。

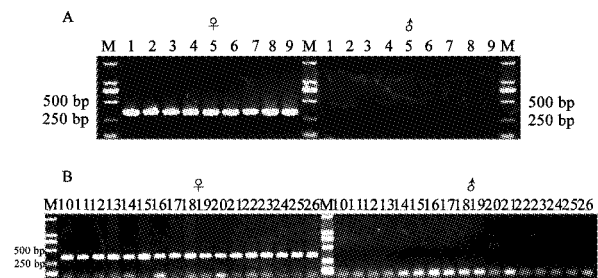


图 8 半滑舌鳎雌性特异 SCAR 标记
Fig. 8 Female-specific SCAR marker in half-smooth tongue-sole

A: 左边 1~9 为雌性个体,右边 1~9 为雄性个体, M 为分子量标准 DL2000;
B: 左边 10~26 为雌性个体,右边 10~26 为雄性个体, M 为分子量标准 DL2000

3 讨论

鱼类属于低等脊椎动物,性别分化较为原始,通过细胞遗传学手段,在大多数鱼类很难找到性别特异的染色体,因此通过观察染色体形态很难鉴定其遗传性别^[10]。分子克隆与 DNA 分子标记技术的发展,为寻找鱼类性别特异分子标记提供了技术手段^[11]。人们利用 RAPD、RFLP、AFLP 和微卫星技术,已经在大麻哈鱼等鲑鳟鱼类找到性别特异的 DNA 序列。在这些分子标记技术中,AFLP 技术是非常有效的分子标记技术之一:首先,每个引物组合都能产生大量的位点;其次,AFLP 标记转化成为 SCAR 标记快速而且简单。AFLP 被广泛用于品种鉴定^[12-13]、遗传多样性研究^[14]、重要性状标记筛选和遗传图谱构建^[15-16]以及性别鉴定^[17-18]等领域。相对于高等脊椎动物,在鱼类中找到的性别连锁的基因和标记还比

较少,目前筛选到的性别特异分子标记也都是雄性特异的,这可能与鱼类的性染色体类型有关系,我国已研究过的具有异型性染色体的 14 种鱼类,有 12 种是雌性同配性别,只有 2 种是雄性同配性别^[19]。由于不同鱼类的遗传差异很大,一种鱼类上筛选出的性别特异标记,在其它鱼类上一般是不能通用的,因此,不同鱼类应该分离筛选各自的性别特异的分子标记^[20-22]。

半滑舌鳎是一种很有养殖前途的经济鱼类,其人工育苗技术已经过关。但由于半滑舌鳎雄性个体生长缓慢,养殖雄性个体不具有经济效益,因而限制了半滑舌鳎鱼苗的推广和养殖产业的形成。因此,开展半滑舌鳎性别控制研究,培育半滑舌鳎全雌苗种是实现半滑舌鳎产业化养殖的关键。但迄今为止,有关半滑舌鳎的研究报道大多涉及生长与繁殖,性别方面的研究很少,周丽青等^[8]通过对 4 尾出现雌雄性别分化的 1 龄鱼进行染色体观察,初步发现半滑舌鳎具异型性染色体。本研究采用 AFLP 标记技术,扫描半滑舌鳎基因组 DNA,筛选到了 7 个雌性特异的 AFLP 标记,经过验证发现这些片段在所研究的雌性个体中出现的频率为 100%,通过将 AFLP 标记转化为 SCAR 标记,我们成功地建立了半滑舌鳎遗传性别鉴定的 PCR 技术。

AFLP 是品种鉴定、遗传多样性研究、重要性状标记筛选和遗传图谱构建的一种十分有效的分子标记手段。但是,标记的获得程序十分复杂,成本很高,有时还要用到同位素,所以无法在实际工作中进行推广应用。本研究将 AFLP 标记转化为 SCAR 标记,应用起来就十分方便了。提取鉴定对象的基因组 DNA 作为模板,利用这对 SCAR 标记特异引物,做一个 PCR 反应,观察琼脂糖凝胶电泳产物,就可以鉴定其性别,不必等到子代性成熟,这样就可以有效缩短育种周期,降低成本。

半滑舌鳎性别特异 AFLP 标记的获得,对于鱼类性别决定机制的基础理论研究和半滑舌鳎养殖业发展都具有重要的理论意义和重大的应用价值。在基础研究方面,这些性别特异 AFLP 标记为分离克隆半滑舌鳎性别决定基因,研究半滑舌鳎甚至鱼类的性别决定机制奠定了重要基础;而本项研究建立的半滑舌鳎遗传性别鉴定技术为半滑舌鳎人工性别控制和全雌育种研究奠定了重要基础,提供了技术手段。

承蒙山东省海阳市黄海水产有限公司刘寿堂总经理和莱州明波水产有限公司的翟介明总经理在提供实验鱼上给予的方便,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Vos P, Hogers M, Rejjians M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 407-414.
- [2] 李 静, 陈松林, 温海深. 鱼类性别相关基因及性别特异标记的研究进展 [J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(4): 90-95.
- [3] Griffiths R, Orr K J, Adam A, *et al.* DNA sex identification in the three-spined stickleback [J]. *J Fish Biol*, 2000, 57: 1331-1334.
- [4] Watanabe T, Yoshida M, Nakajima M, *et al.* Linkage mapping of AFLP and microsatellite DNA markers with the body color and sex-determining loci in the guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Zoolog Sci*, 2005, 22(8): 883-889.
- [5] 孟田湘, 任胜民. 渤海半滑舌鳎的年龄与生长 [J]. *海洋水产研究*, 1988, 9: 173-183.
- [6] 姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛, 等. 渤海半滑舌鳎人工育苗工艺技术的研究 [J]. *海洋水产研究*, 1993, 14: 25-33.
- [7] 陈京华, 赵 波. 半滑舌鳎的生物学特性及养殖技术 [J]. *水产科技情报*, 2005, 32(3): 105-109.
- [8] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析 [J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 417-419.
- [9] Chen S L, Hong Y, Scherer S J, *et al.* Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. *Gene*, 2001, 264: 197-203.
- [10] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208: 191-364.
- [11] Devlin R H, Biagi C A, Smailus D E. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon [J]. *Genetica*, 2001, 111: 43-58.
- [12] Scott K D, Ablett E M, Lee L S, *et al.* AFLP markers distinguish an early mutant of flame seedless grape [J]. *Euphytica*, 2000, 113: 245-249.
- [13] 祝 军, 王 涛, 赵玉军, 等. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种 [J]. *园艺学报*, 2000, 27(2): 102-106.

- [14] Vander S J, Weltjens I, Gama L S, *et al.* Genetic diversity in Mexican *Stylosanthes humilis* as revealed by AFLP, compared to the variability of *S. humilis* accessions of South American origin [J]. *Euphytica*, 2000, 113: 145 - 154.
- [15] Lu Z X, Sosinski B, Reighard G L, *et al.* Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes peach rootstocks [J]. *Genome*, 1998, 41: 199 - 207.
- [16] Maliepaard C, Alston F H, Van A G, *et al.* Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 60 - 70.
- [17] 王艺磊, 戴 军, 姚扬烈. 利用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 片段 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(4): 286 - 290.
- [18] Griffiths R, Orr K. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers [J]. *Molecular Ecol*, 1999, 8(4): 671 - 674.
- [19] 杨 东, 余来宁. 鱼类性别与性别鉴定 [J]. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 221 - 226.
- [20] Iturra P, Medrano J F, Bagley M, *et al.* Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout [J]. *Genetica*, 1997, 101(3): 209 - 213.
- [21] Iturra P, Bagley M, Vergara N, *et al.* Development and characterization of DNA sequence OmyP9 associated with the sex chromosomes in rainbow trout [J]. *Heredity*, 2001, 86: 412 - 419.
- [22] Volf J N, Kondo M, Scharl M. Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish [J]. *Trends Genet*, 2003, 19(4): 196 - 199.

《上海水产大学学报(1992 - 2006 年)》光盘介绍

《上海水产大学学报》是由上海水产大学主办的、以水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要反映水产各学科科研成果,促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖与增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究等方面的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、简讯等。

《上海水产大学学报》每年与日本、韩国、菲律宾、英国、加拿大等国的有关机构和图书馆建立期刊交流关系,并通过中国国际图书贸易总公司对国外发行。除书本式发行外,《上海水产大学学报》还加入了《中国科技期刊(光盘版)》的发行和万方数据资源系统数字化期刊群,通过因特网加强了与国内外读者、作者的交流,扩大了刊物学术影响力。

《上海水产大学学报》为全国水产渔业类核心期刊、全国高校优秀自然科学学报,被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)和《水科学和渔业文摘》(ASFA)等十余种国内外检索刊物、数据库列为收录源。据 2006 年中国科技信息研究所信息分析中心最新提供的期刊检索报告的结果,《上海水产大学学报》的影响因子和被引频次分别在全国水产类期刊中排名第 4 位和第 4 位。

为了便于广大作者及读者的保存和查阅,编辑部将《上海水产大学学报》自 1992 年创刊至 2006 年底已出版的所有杂志编辑成具有分类、关键词、作者、出版时间等检索途径和打印功能的全文数据库光盘,定价为 50 元(含邮费),如需要购买,请与编辑部联系。另外,对已购买过旧版光盘的读者,编辑部将提供免费升级服务,请读者主动与编辑部张美琼老师联系。

地 址:上海市军工路 334 号,上海水产大学 48 信箱

邮 编:200090

电 话:021 - 65678640

E-mail: jfc@shfu.edu.cn